CRYOcheck™ IVD
PREKALLIKREIN DEFICIENT PLASMA
Plasma déficient pour le test de coagulation pour la prékallikréine

PrecisionBioLogic

CRYOcheck™

Factor Deficient Plasmas
PREKALLIKREIN DEFICIENT PLASMA

Intended Use

CRYOcheck Prekallikrein Deficient Plasma is recommended for use as a deficient substrate in clot-based prekallikrein assays using the activated partial thromboplastin time (APTT).

Summary and Principle

Deficiencies in coagulation factors may have congenital or acquired etiologies and can compromise *in vivo* hemostasis[1]. Prekallikrein (Fletcher factor) is a single-chained glycoprotein with a molecular weight of 85,000 - 88,000 Da and is necessary for intrinsic coagulation[2]. Plasma samples deficient in prekallikrein exhibit a prolonged APTT which shortens to normal on prolonged incubation with an activating reagent. Prekallikrein deficiency is commonly diagnosed through the use of a modified APTT assay. When a patient sample is mixed with prekallikrein deficient plasma, the degree of correction of the APTT is proportional to the level of prekallikrein in the patient plasma[3,4].

Reagents

CRYOcheck Prekallikrein Deficient Plasma consists of citrated human plasma from a single prekallikrein deficient donor, who has been assayed at less than 1% of normal levels for prekallikrein. The plasma is then buffered with HEPES buffer, aliquoted, and rapidly frozen. Other factors have been assayed and results are provided on the Certificate of Analysis that accompanies each lot number.



All blood products should be treated as potentially infectious. Source material from which this product was derived was found to be negative when tested in accordance with current FDA required tests. No known test methods can offer assurance that products derived from human blood will not transmit infectious agents. Accordingly, these human blood based products should be handled and discarded as recommended for any potentially infectious human specimen[5].

Storage and Handling

When stored at -40 to -80°C, CRYOcheck Prekallikrein Deficient Plasma is stable to the end of the month indicated on the product packaging.

Thaw each vial at 37°C (± 1°C) in a waterbath. **The use of a dry bath or heating block for thawing is not recommended.** Thawing times are important and should be strictly adhered to. The use of a timer is recommended. Refer to the Thawing Table for recommended thawing times based on aliquot size. Allow thawed plasma to acclimate to room temperature (18 to 25°C) and invert gently prior to use.

Thawing Table	
Aliquot Size	**37°C (± 1°C) Waterbath**
1.0 mL	4 minutes

CRYOcheck Prekallikrein Deficient Plasma may be used for up to eight hours after thawing, if capped in the original vial and maintained at 2 to 8°C. Allow refrigerated plasma to acclimate to room temperature (18 to 25°C) and invert gently prior to use. **Thawed material should be discarded after eight hours and should not be refrozen.**

Availability

Product	Catalog #	Format
Prekallikrein Deficient Plasma	FDPK-10	10 vials x 1.0 mL

Instruments

Each lab should prepare the local instrument in accordance with the manufacturer's instructions for use.

Procedure

After thawing and preparing CRYOcheck Prekallikrein Deficient Plasma, use in accordance with established laboratory procedures for the quantitative assessment of Prekallikrein.

Materials Provided

- CRYOcheck Prekallikrein Deficient Plasma

Materials Required but not Provided

- Waterbath capable of maintaining 37°C (± 1°C)
- Assay reagents
- $CaCl_2$
- Owren's Veronol Buffer or equivalent
- Coagulation instrument or assay system
- Calibration plasma (e.g. CRYOcheck Normal Reference Plasma)
- Quality control material (e.g. CRYOcheck Reference Control Normal, CRYOcheck Abnormal 1 Reference Control)
- 2 cycle log-log graph paper
- Plastic test tubes (e.g. 12 x 75 mm)
- Sample cups
- Plastic disposable pipettes
- Volumetric pipette
- Timer

Standard Curve Preparation

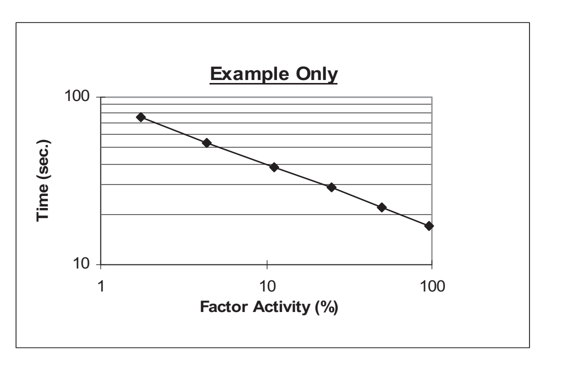
Methods may vary according to instrumentation used. Consult the instrument manufacturer's instruction manual for recommended factor assay (intrinsic) protocols.

1. Prepare assay reagents, calibration plasma, and buffer according to manufacturer's directions.
2. Make serial dilutions of calibration plasma from 1:160 to 1:5120 in buffer as follows:

Tube No.	Volume of Buffer	Volume of Calibration Plasma	Dilution	% Factor
1	1590 µL	10 µL calibration plasma	1:160	100
2	1.0 mL	1.0 mL of Tube No. 1	1:320	50
3	1.0 mL	1.0 mL of Tube No. 2	1:640	25
4	1.0 mL	1.0 mL of Tube No. 3	1:1280	12.5
5	1.0 mL	1.0 mL of Tube No. 4	1:2560	6.25
6	1.0 mL	1.0 mL of Tube No. 5	1:5120	3.12

*Note: This is an **example only** of a serial dilution profile prepared using calibration plasma with a prekallikrein level of 100%. Always be sure to utilize the lot-specific prekallikrein level of the calibration plasma in use. If using CRYOcheck Normal Reference Plasma, refer to the lot-specific Assay Certificate.*

3. Prewarm APTT reagent and calcium chloride to 37°C (± 1°C).
4. To a coagulation reaction cuvette, add 0.1 mL of CRYOcheck Prekallikrein Deficient Plasma, 0.1 mL of Tube No. 1 (100% of factor), and 0.1 mL of prewarmed APTT reagent. Mix and incubate according to the manufacturer's directions.
5. Add 0.1 mL of prewarmed calcium chloride and simultaneously initiate the clot timer. Record clotting times in seconds.
6. Repeat steps 4 and 5 for Tube No.'s 2 to 6.
7. On log-log graph paper plot clotting times in seconds (y-axis) vs. % of prekallikrein activity (x-axis).
8. Construct the standard curve by drawing the best straight line fit through the plots.



Specimen Collection and Preparation

Patient samples should be collected into 105 - 109 mmol/L sodium citrate dihydrate anticoagulant (3.2%) in a ratio of 9 parts blood to 1 part anticoagulant. Patient plasma is derived by centrifugation at 1500 x g for 15 minutes and should be tested within four hours of collection when maintained at 2 to 4°C in accordance with CLSI guidelines[6].

Assay Procedure

1. Prepare a 1:160 dilution of patient plasma with buffer.
2. Repeat steps 3 through 5 of Standard Curve Preparation, substituting diluted patient plasma for diluted calibration plasma.
3. Read the percent prekallikrein activity from the standard curve by finding the point where the clotting time intercepts the curve, then reading the percent prekallikrein activity off the x-axis.
4. Further dilutions of patient plasma may be prepared and tested to confirm the value.

Quality Control

Each laboratory should establish its own quality control (QC) ranges using acceptable statistical methods. These QC ranges may then be used to monitor and validate the integrity of the test system[7]. For all coagulation tests, the laboratory must include at least two levels of control for every eight hours of operation and any time a change in reagents occurs[8].

Results

Prekallikrein activity values recovered below the normal range may be indicative of a prekallikrein deficiency (congenital or acquired). Each laboratory should establish its own normal range for prekallikrein activity in accordance with CLSI guidelines[9].

Limitations of the Procedure

Plasmas deficient in factor XII or containing lupus anticoagulants may give falsely low prekallikrein results. When proper control values are not obtained, assessment of each component of the test system including reagents, control plasmas, instrumentation and operator technique must be undertaken in order to ascertain that all other components are functioning properly[10].

Expected Values

Expected values may vary according to reagent, instrument and technique employed. It is recommended each laboratory establish its own normal range for prekallikrein activity.

Performance Characteristics

When used according to recommended methods, results are subject to the limitations of the assay system (i.e. reagents, instrument) in use.

CRYOcheck™

PREKALLIKREIN DEFICIENT PLASMA
Plasma déficient pour le test de coagulation pour la prékallikréine

Intérêt du Coffret

Le CRYOcheck Prekallikrein Deficient Plasma est recommandé pour l'évaluation de l'activité de la prékallikréine par la méthode de dosage du temps de céphaline activateur (TCA) nécessitant l'emploi d'un plasma dépourvu en prékallikréine.

Résumé et Principe

Les déficiences en facteur de coagulation peuvent avoir des origines congénitales ou acquises et peuvent compromettre le processus de l'hémostase *in vivo*[1]. La prékallikréine (facteur Fletcher) est une glycoprotéine d'un poids moléculaire d'environ 85 000 - 88 000 Da. Elle est nécessaire pour la voie intrinsèque de la coagulation[2]. Les plasmas déficients en prékallikréine ont un temps coagulation en présence céphaline activateur (TCA) plus ou moins allongé. Une déficience en prékallikréine est couramment diagnostiquée au travers le dosage d'un TCA modifié où tous les facteurs sont présents et en excès à l'exception de la prékallikréine apporté successivement par les plasmas dilués du témoin et des malades. Dans ces conditions, le degré de correction du TCA est proportionnel au niveau de prékallikréine dans le plasma du patient[3,4].

Réactifs

Le CRYOcheck Prekallikrein Deficient Plasma est un mélange de plasmas humains citrates provenant de plasma de donneurs déficience en prékallikréine, tamponné avec de l'HEPES, aliquote et congelé rapidement. Le CRYOcheck Prekallikrein Deficient Plasma a été validé comme ayant moins de 1% du taux normal, par méthode fonctionnelle.



Tous les produits sanguins doivent être traités comme potentiellement infectieux. Les matières dont ils dérivent, ont été testées suivants les directives imposées par la FDA. Cependant, aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance que les produits dérivés du sang humain ne transmettent pas d'agents infectieux. En conséquence, ces produits issus de sang humain doivent être manipulés et détruits comme préconisés pour tout échantillon potentiellement infectieux[5].

Conservation et préparation du réactif

Ce plasma est stable, s'il conservé congelé entre -40 et -80°C, jusqu'à la fin du mois de la date de péremption indiquée sur l'emballage.

Décongeler chaque flacon à 37°C (± 1°C) dans un bain-marie. **L'utilisation d'un bain sec ou d'un bloc chauffant pour la décongélation n'est pas recommandée.** Les temps de décongélation sont importants et doivent être rigoureusement respectés, un chronomètre est recommandé. Se référer aux tables de décongélation basées sur la taille des aliquotes. Laisser les plasmas décongelés se stabiliser à la température ambiante (18 à 25°C) et retourner doucement avant utilisation.

Table de Décongélation	
Taille de l'aliquote	**Bain-marie à 37°C (± 1°C)**
1.0 ml	4 minutes

Ce plasma doit être utilisé dans les huit heures suivant la décongélation, s'il est conservé dans son flacon d'origine, à 2 à 8°C. **Le matériel décongelé doit être détruit après huit heures et ne doit pas être recongelé.**

Disponibilité

Produit	Référence	Présentation
Prekallikrein Deficient Plasma	FDPK-10	10 flacons de 1.0 ml

Instruments

Chaque laboratoire doit préparer les instruments nécessaires stipulés dans les instructions du fabricant.

Procédure

Après décongélation et préparation du CRYO*check* Prekallikrein Deficient Plasma, utilisez, comme décrit, les procédures établies au laboratoire pour des dosages quantitatifs de la prékallikréine.

Matériel fourni

- CRYO*check* Prekallikrein Deficient Plasma

Matériels requis mais non fournis

- Bain-marie (37°C ± 1°C)
- Réactifs de dosage du TCA
- $CaCl_2$
- Tampon Owren-Koller ou équivalent
- Instrument de coagulation ou système de dosage
- Plasma de calibration (ex. CRYO*check* Normal Reference Plasma)
- Matériel de contrôle qualité (ex. CRYO*check* Reference Control Normal, CRYO*check* Abnormal 1 Reference Control, CRYO*check* Abnormal 2 Reference Control)
- Pipettes plastiques
- Chronomètre
- Papier Log-Log
- Tubes à essai en plastique
- Tasses à échantillon
- Pipette volumétrique

Préparation des courbes standards

La méthode peut varier selon les instruments utilisés. Consulter le manuel d'instructions du fabricant d'instrument pour les protocoles de dosages de facteurs.

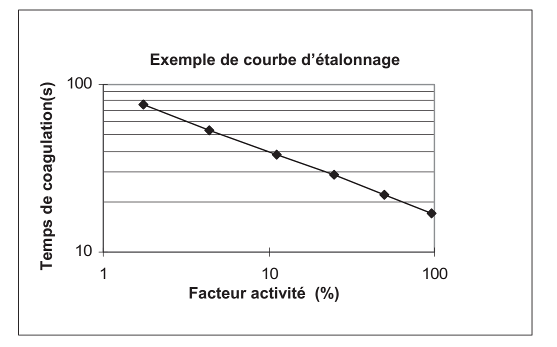
Dans la mesure du possible, tous les essais seront réalisés simultanément.

1. Préparer les réactifs de dosage, les plasmas de calibration et les tampons selon les directives du fabricant.
2. Faire une série de dilutions du plasma de calibration du 1/160ème au 1/5120ème dans du tampon comme suit (la dilution au 1/160ème correspond au taux de base):

N° Tubes	Volume de tampon	Volume de plasma de calibration	Dilution	% Facteur
1	1590 µl	10 µl du plasma de calibration	1/160	100
2	1 ml	1 ml du tube 1	1/320	50
3	1 ml	1 ml du tube 2	1/640	25
4	1 ml	1 ml du tube 3	1/1280	12.5
5	1 ml	1 ml du tube 4	1/2560	6.25
6	1 ml	1 ml du tube 5	1/5120	3.12

Note: Il ne s'agit ici que d'un exemple de dilutions en série préparées avec le plasma de calibration avec un taux de prekallikrein de 100%. Toujours s'assurer d'utiliser le lot correspondant au taux de prekallikrein du plasma de calibration utilisé. Pour le plasma CRYOcheck Normal Reference Plasma, voir le Certificat d'analyse sur le lot utilisé.

3. Préchauffer le réactif TCA et le $CaCl_2$ à 37°C (± 1°C).
4. Ajouter 0.1 ml de plasma déficient en prékallikréine à la cuvette de réaction de coagulation, 0.1 ml du tube 1 (100%) et 0.1ml du réactif TCA à 37°C. Mélanger et incuber suivant les instructions du fabricant du TCA.
5. Ajouter 0.1 ml de $CaCl_2$ préchauffé et simultanément commencer la mesure du temps de coagulation. Enregistrer ce temps en secondes.
6. Répéter les étapes 4 et 5 pour les tubes 2 à 6.
7. Tracer sur papier log-log les temps obtenus sur l'axe des y et le % du taux de prékallikréine sur l'axe des x.
8. Construire la courbe standard en traçant la meilleure droite passant par tous les points.



Prélèvement et préparation

Les prélèvements du sang de patients doivent être collectés sur une solution anticoagulante de citrate trisodique (3.2%) de concentration 105 - 109 mmol/l dans un ratio de 9 volumes de sang pour 1 volume d'anticoagulant. Le plasma de patient est obtenu par centrifugation à 1500 x g pendant 15 minutes et doit être testé quatre heures après le prélèvement quand il est maintenu à 2 à 4°C comme convenu dans les instructions du CLSI[6].

Procédure de dosage

1. Préparer une dilution au 1/160ème du plasma du patient avec du tampon.
2. Répéter les étapes 3 à 5 de la Préparation de la courbe standard, en substituant le plasma de calibration dilué par celui du patient.
3. Lire le pourcentage d'activité de la prékallikréine à partir de la courbe standard en joignant le point où le temps de coagulation intercepte la courbe, on lit alors le pourcentage d'activité de la prékallikréine sur l'axe des x.
4. Plusieurs dilutions du plasma du patient peuvent être préparées et testées afin de confirmer cette valeur.

Contrôle de qualité

Chaque laboratoire doit établir ses propres normes de contrôle qualité en utilisant des méthodes statistiques acceptables. Ces normes doivent être utilisées afin de contrôler et de valider l'intégrité des systèmes de test[7]. Pour tous les tests de coagulation, le laboratoire doit inclure au moins deux niveaux de contrôle toutes les huit heures et en aucun cas, un changement de réactifs ne doit intervenir[8].

Résultats

Les valeurs d'activité de la prékallikréine trouvées en dessous de la normale peuvent indiquer une déficience en prékallikréine (congénitale ou acquise). Chaque laboratoire doit établir sa propre gamme pour l'activité de la prékallikréine en accord avec les instructions du CLSI[9].

Limites de la Méthode

Quand des valeurs attendues des contrôles ne sont pas conformes, le contrôle de chaque composant du système de mesure (réactifs, plasmas de contrôle, instrument et technique opératoires) doit être effectué afin de s'assurer que tous les composants sont fonctionnellement corrects[10].

Valeurs Attendues

Les valeurs attendues peuvent varier suivant les lots de réactifs, les instruments et les techniques employées. Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir sa propre gamme normale d'activité de la prékallikréine.

Performances

Se référer au certificat de contrôle de qualité pour les spécifications des facteurs de la coagulation pour chaque numéro de lot de plasma déficient en prékallikréine. Quand ils sont utilisés selon les méthodes préconisées, les résultats sont soumis aux limitations propres liées au système de dosage.

Bibliography / Bibliographie

1. Biggs R. Human blood coagulation, haemostasis and thrombosis 3rd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1984.
2. Halkier T. Mechanisms in blood coagulation, fibrinolysis, and the complement system. Cambridge: Cambridge University Press; 1991.
3. Triplett DA, Smith C. Routine testing in the coagulation laboratory. In: Triplett DA, editor. Laboratory evaluation of coagulation. Illinois: ASCP Press; 1982. p. 28-51.
4. Hathaway WE, Belhasen LP, Hathaway HS. Evidence of a new thromboplastin factor: Case report, coagulation studies and physiochemical studies. Blood 1965; 26(5):521-32.
5. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories 4th ed. Centers for Disease Control and Prevention / National Institutes of Health, 1999.
6. Collection, transport, and processing of blood specimens for coagulation testing and general performance of coagulation assays, CLSI, H21-A3. 1998.
7. Cembrowski GS, Carey RN. Laboratory quality management. Chicago: ASCP Press; 1989.
8. CLIA 1988 – Code of Federal Regulations, 42CFR493.1253, 1998.
9. Determination of Factor Coagulant Activities, CLSI, H48-A. 1997.
10. Gilmer PR. Preanalytical variables in coagulation testing. In: Triplett DA, editor. Laboratory evaluation of coagulation. Illinois: ASCP Press; 1982. p. 1-8.

EC REP European Authorized Representative (Regulatory affairs only)
Emergo Europe Molenstraat 15, 2513 BH The Hague, The Netherlands
Tel: (+31) 70 345 8570 Fax: (+31) 70 346 7299



Symbols used / Symboles utilisés 09.60.00027 Rev. 10 February / février 2011

				 	 	
In vitro diagnostic medical device	Batch code	Use by	Temperature limitation	Biological risks	Manufacturer	Authorized representative
Dispositif médical de diagnostic *in vitro*	Désignation du lot	Date de péremption	Températures limites de conservation	Risque biologique	Fabricant	Mandataire

Precision BioLogic Inc. • 140 Eileen Stubbs Avenue • Dartmouth, NS • B3B 0A9 •Canada
Tel: 1.800.267.2796 / +1.902.468.6422 • Fax: 1.800.267.0796 / +1.902.468.6421 • www.precisionbiologic.com